

Sirt1 对糖尿病心肌病大鼠早期心肌 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶的调节作用及其机制研究

李超凡 徐丹 李婷 官明德

【摘要】 目的:通过建立糖尿病大鼠模型,探讨沉默信息调节因子(Sirt1)对 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(SAHH)糖尿病心肌病早期的调节作用及其机制。 方法:采用高脂饮食联合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型,分为对照组、早期糖尿病模型组(DM 组)和白藜芦醇处理组(RES 组),RES 组给予白藜芦醇 2.5 mg/(kg·d)灌胃 2 周处理。HE 染色法观察心肌组织病理结构变化,超声心动图检测心功能相关指标,高效液相色谱法检测同型半胱氨酸(Hcy)、S-腺苷甲硫氨酸(SAM)及 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH),Western blot 检测各组心肌组织 SAHH、Sirt1 等蛋白表达变化。 结果:显微镜下 DM 组大鼠心肌组织可见不同程度炎细胞浸润、甚至变性,而 RES 组心肌组织可见少量炎性细胞浸润,少量心肌细胞呈长杆状,坏死灶不明显,嗜酸性变较 DM 组轻。HPLC 检测结果显示对照组、DM 组和 RES 组的 Hcy 分别为(45.37±7.99)、(101.78±16.77)和(86.33±10.09) μmol/L,DM 组和 RES 组较对照组升高,但 RES 组低于 DM 组;SAH 分别为(50.33±7.34)、(22.92±4.32)和(33.45±7.88) μmol/L,DM 组和 RES 组较对照组降低,但 RES 组高于 DM 组;SAM 分别为(66.34±9.99)、(69.56±9.01)和(70.89±11.33) μmol/L,各组间无显著差异;SAHH 分别为(44.11±5.17)、(92.33±17.56)和(19.73±4.07) μmol/L,DM 组较对照组升高,RES 组较对照组降低;Sirt1 分别为(80.12±10.09)、(29.11±3.91)和(107.32±13.24) μmol/L,DM 组较对照组降低,RES 组较对照组升高。 结论:SAHH 及下游 Hcy 等的表达可能是早期糖尿病心肌病发生发展的重要作用机制,而 Sirt1 对 SAHH 的表达调控作用可能起重要作用。

【关键词】 糖尿病心肌病;沉默信息调节因子 1;S-腺苷同型半胱氨酸水解酶;同型半胱氨酸;S-腺苷甲硫氨酸;S-腺苷同型半胱氨酸

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.06.008

Research on the regulation and mechanism of Sirt1 on S-adenosylhomocysteine hydrolase in the early stage of diabetic cardiomyopathy rats LI Yuefan, XU Dan, LI Ting, GUAN Mingde. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Shandong 266042, China

【Abstract】 Objective: To detect the mechanism of silent information regulator 1 (Sirt1) in regulating S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) in the early occurrence and development of diabetic cardiomyopathy by establishing diabetes rat model. **Methods:** The type 2 diabetes rat model was established by high fat diet with injection of streptozocin. The rats were randomly divided into control group, early diabetes mellitus model group (DM group) and the group with treatment of Resveratrol (RES group). RES group received 2.5 mg/(kg·d) resveratrol by gavage for 2 weeks. HE staining was

used to observe the morphological changes of myocardial tissue. Cardiac function indexes were examined by echocardiography. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect homocysteine (Hcy), S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosyl-L-homocysteine (SAH). The alterations of SAHH and Sirt1 in myocardia were determined by western blot. **Results:** HE staining showed different levels of infiltration by inflammatory cells and even degeneration in myocardial cells of DM group rats. According to the HPLC results, the expression trends of Hcy and SAH is opposite, the expression of Hcy in DM model group increased, while RES group showed reduced expression trend, which showed a significant difference with the DM group. However, the SAM did not have significant change between the groups. Compared with the control group, the expression of SAHH increased in DM group, while in the RES group, the expression declined compared with DM group. Correspondingly, the Sirt1 showed the opposite trends (all $P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of SAHH, Hcy and other related factors may be important mechanism during the occurrence and development of early diabetic cardiomyopathy, and the regulation of Sirt1 on SAHH may be an important part of the mechanism.

【Key words】 Diabetic cardiomyopathy; Silent information regulator 1; S-adenosylhomocysteine hydrolase; Homocysteine; S-adenosylmethionine; S-adenosyl-L-homocysteine

S-腺苷同型半胱氨酸水解酶 (S-adenosylhomocysteine hydrolase, SAHH) 在细胞内广泛存在, 它催化水解 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH) 生成腺苷和同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy), 其中 SAH 是由 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 提供甲基参与 DNA、组蛋白的甲基化而产生^[1], 抑制 SAHH 将导致细胞内 SAH 的蓄积。近年来, 关于 SAHH 的研究主要集中在体外抑制剂方面^[2-3]。研究发现 Hcy 还参与糖尿病肾病、糖尿病视网膜病等慢性并发症的发生^[4-5]。有研究指出 SAH 与 Hcy 可以共同作为慢性心血管病的标志物^[6]。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, Sirt1) 为哺乳动物 Sirtuins 家族成员, 是一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的去乙酰化酶, 参与机体多种信号通路的调控作用^[6-7]。SAHH 同样可以参与糖尿病心肌病的发生发展过程^[8], 但具体作用机制仍未明确。我们建立 2 型糖尿病大鼠模型, 探究 Sirt1 对 SAHH 及下游 Hcy 等因子表达调控的可能机制。

1 对象与方法

1.1 动物与试剂

链脲菌素产自美国 Sigma 公司; 生物素标记山羊抗兔 IgG/小鼠 IgG 二抗试剂盒产自北京中杉金桥生物公司; Hcy、L-多聚赖氨酸 (poly-L-lysine)、谷氨酰胺购自 Sigma 公司; SAHH、 β -actin 产自美国 Cell Signaling Technology 公司、Sirt1 产自美国 LifeSpan 公司。健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠由山东省医学科学院动物中心提供, 合格证号 SCXK (鲁)2016-0104。

1.2 动物模型构建及分组

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 35 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组 10 只, 糖尿病模型组 25 只。采用高脂饮食灌胃, 并于 5 周末禁食 12 h 后一次性腹腔注射 1% 链脲菌素。造模后 72 h 尾静脉采血, 血糖试纸检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 以 $FBG \geq 11.1$ mmol/L, 并出现多饮、多食、多尿和体质量下降为糖尿病大鼠造模成功。造模成功大鼠随机分为早期糖尿病模型组 (DM 组)、白藜芦醇处理组 (RES 组)。DM 组以高脂饮食灌胃 4 周, RES 组在高脂饮食基础上, 于 2 周末灌胃给予白藜芦醇 2.5 mg/(kg·d), 持续到 4 周末; 对照组以普通饲料喂养。

1.2 HE 染色

取大鼠心肌石蜡切片常规脱蜡至水, 先后经苏木素染色, 盐酸酒精分化, 伊红染色, 梯度酒精常规脱水, 中性树胶封片等步骤。采用 Eclipse TE 2000-S 免疫荧光显微镜拍照, 观察心肌组织病理结构的改变。

1.3 高效液相色谱测定 Hcy、SAH 及 SAM 水平

取心肌组织加入裂解液充分研磨后, 低温离心取上清, 测定总蛋白浓度。取研磨后上清液注入 HPLC, 用线性梯度洗脱方式将样品从色谱柱洗脱。线性梯度如下: 0~0.5 min, 100% A; 0.5~20 min, 75% A 和 25% B; 20~30 min, 75% B 和 25% A 30~45 min, 100% B (A 为 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液, pH=6; B 为 1:1 的乙腈和水)。色谱图采用惠普公司 HP3394 积分仪记录, 所有实验进行 5 次并进行定量分析, 通过比较标准曲线峰面积及 SAM 和

SAH 的洗脱峰面积获得心肌组织 Hcy、SAM 和 SAH 水平。

1.4 Western blot 检测

取心肌组织加入含 PMSF 的裂解液充分研磨，离心后取上清，测定总蛋白浓度。40~70 μg 总蛋白采用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离。湿法转膜，脱脂奶粉封闭后与相应一抗共孵育过夜，与辣根过氧化物标记的二抗共孵育，用增强型化学发光试剂进行显色，并利用灰度分析软件定量分析。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析，计量数据以均数 ± 标准差表示，组间比较采用方差分析及 t 检验，以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心肌组织学检查结果比较

对照组大鼠心肌组织结构正常心肌细胞排列整齐，纹理清晰，核居中，细胞核均匀分布；心肌细胞的纵切面横纹清晰，核居中；横切面为不规则的多角形；间质为少量血管及结缔组织。DM 组大鼠心肌部分细胞核变为长杆状，排列略显紊乱；局部心肌细胞排列疏松，间质水肿，散在大量炎性坏死灶，坏死处肌纤维断裂，炎性细胞聚集，大量肌细胞浆嗜酸性增强。RES 组大鼠心肌组织可见少量炎性细胞浸润，少量心肌细胞为长杆状，坏死灶不明显，嗜酸性变较 DM 组轻。见图 1。

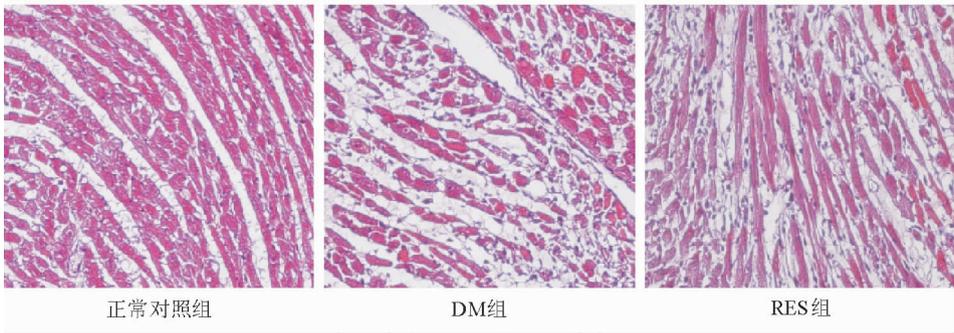


图 1 各组大鼠心肌组织 HE 染色 (×200)

2.2 HPLC 检测相关氨基酸的表达

与对照组相比，Hcy 水平在 DM 组、RES 组大鼠心肌组织中显著升高 (P<0.01)，但 RES 组明显低于 DM 组 (P<0.05)。与对照组相比，SAH 水平在 DM 组、RES 组中显著降低 (P<0.05)，而 SAM

水平各组无明显差异。与对照组相比，DM 组和 RES 组 SAM/SAH 比值显著升高 (P<0.01)；但 RES 组 SAM/SAH 比值显著低于 DM 组 (P<0.05)。见表 1。

表 1 HPLC 检测各组大鼠心肌组织相关氨基酸水平/μmol · L⁻¹

| 组别 | n | Hcy | SAM | SAH | SAM/SAH |
|-------|----|---------------------------------|---------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 对照组 | 10 | 45.37 ± 7.99 | 66.34 ± 9.99 | 50.33 ± 7.34 | 1.38 ± 0.18 |
| DM 组 | 10 | 101.78 ± 16.77 ⁽²⁾ | 69.56 ± 9.01 | 22.92 ± 4.32 ⁽¹⁾ | 3.04 ± 0.25 ⁽²⁾ |
| RES 组 | 11 | 86.33 ± 10.90 ⁽¹⁾⁽³⁾ | 70.89 ± 11.33 | 33.45 ± 7.88 ⁽¹⁾ | 2.12 ± 0.35 ⁽¹⁾⁽³⁾ |

注：与对照组比较，⁽¹⁾P<0.05，⁽²⁾P<0.01；与 DM 组比较，⁽³⁾P<0.05

2.3 各组 SAHH 和 Sirt1 的比较

与对照组相比，DM 组 SAHH 的表达显著升高，RES 组 SAHH 表达显著降低 (P<0.01)；与对照组相比，Sirt1 在 DM 组大鼠心肌组织中表达显著降低 (P<0.01)，而在 RES 组表达明显增加 (P<0.01)。见表 2。

表 2 大鼠心肌组织 SAHH、Sirt1 的表达水平/% (与内参 β-actin 比值)

| 组别 | SAHH | Sirt1 |
|-------|--------------------------------|----------------------------------|
| 对照组 | 44.11 ± 5.17 | 80.12 ± 10.09 |
| DM 组 | 92.33 ± 17.56 ⁽¹⁾ | 29.11 ± 3.91 ⁽¹⁾ |
| RES 组 | 19.73 ± 4.07 ⁽¹⁾⁽²⁾ | 107.32 ± 13.24 ⁽¹⁾⁽²⁾ |

注：与对照组比较，⁽¹⁾P<0.01；与 DM 组比较，⁽²⁾P<0.01

3 讨论

腺苷代谢紊乱在糖尿病心肌病的发病过程中有重要作用^[9]。有研究表明, SAHH 及下游 Hcy 等的表达可能是心血管疾病发生发展的重要作用机制, 而 Sirt1 对 SAHH 的表达调控作用可能是该机制中的重要一环^[10]。

本研究糖尿病模型大鼠进行白藜芦醇灌胃, 探究 Sirt1 激动状态下 SAHH 表达水平的变化, 以及 Sirt1 与 SAHH 表达的关系。我们推测, 糖尿病引起能量代谢紊乱, Sirt1 蛋白水平降低, 而反馈性引起 SAHH 表达升高。在 SAHH 的作用下, 大量 SAH 水解产生 Hcy 和腺苷。白藜芦醇可使 Sirt1 表达增加, 高表达的 Sirt1 抑制了 SAHH 的活性; 同时, Hcy 处在甲硫氨酸循环中 SAH 的下游, 高水平的 Hcy 可引起 SAHH 表达下调, 而 SAHH 不足使 SAH 降解受阻, 导致 SAH 水平升高。SAH 升高使转甲基反应受阻, 甲硫氨酸循环紊乱, 从而促进 DNA 低甲基化的发生。体内 DNA 低甲基化状态又会影响 Hcy 代谢, 而对 SAM 的影响不大。有研究表明, Hcy 通过甲基转移酶途径的再甲基化, 激活胱硫醚- β -合成酶促进胱硫醚合成, 可以促进 SAM 水平的升高, 但短时间内其作用不显著^[11]。本研究表明, 在白藜芦醇的干预下, 糖尿病大鼠血浆 Hcy 水平可显著降低, 而 SAH 水平升高, 可降低 SAM/SAH 比值。Sirt1 在体内可能是 SAHH 内源性抑制剂, 可调节 SAHH 的表达, 能够缓解糖尿病状态下 Hcy 相关的心肌病变及 SAH 诱导的心脏大血管病变。

本研究初步探讨了 SAHH 及上下游氨基酸在糖尿病心肌病中的变化规律, 以及 Sirt1 因子可能的调节作用, 为进一步探究糖尿病心肌病发生发展的机制提供了方向。

参 考 文 献

- [1] Wu QL, Fu YF, Zhou WL, et al. Inhibition of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase induces immunosuppression [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313(2):705-711.
- [2] Nakao A, Suzuki H, Ueno H, et al. Discovery and structural analyses of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors based on non-adenosine analogs [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(15):4952-4969.
- [3] Tardif V, Manenkova Y, Berger M, et al. Critical role of transmethylation in TLR signaling and systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Immunol*, 2013, 147(2):133-143.
- [4] Cho EH, Kim EH, Kim WG, et al. Homocysteine as a risk factor for development of microalbuminuria in type 2 diabetes [J]. *Korean Diabetes J*, 2010, 34:200-206.
- [5] Xiao Y, Su X, Huang W, et al. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 67:158-66.
- [6] Kloor D, Osswald H. S-adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(6):294-297.
- [7] 尹茂山, 许淑红, 王燕, 等. 2 型糖尿病大鼠主动脉 Wnt/ β -catenin 信号通路的变化及 SIRT1 的调节作用 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(3):337-342.
- [8] 尹茂山, 牟艳玲. Sirt1 与心肌保护 [J]. *生命科学*, 2015, 27(5):601-607.
- [9] Kwak HC, Kim YM, Oh SJ, et al. Sulfur amino acid metabolism in Zucker diabetic fatty rats [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96(3):256-266.
- [10] Cao Z, Zhang Y, Sun T, et al. Homocysteine induces cardiac hypertrophy by up-regulating ATP7a expression [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10):12829-12836.
- [11] Iacobazzi V, Castegna A, Infantino V, et al. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool [J]. *Mol Genet Metab*, 2013, 110(1/2):25-34.

(收稿:2017-07-30 修回:2017-09-13)

(本文编辑:丁媛媛)